

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang pengaruh pemberian bentuk sediaan pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap kadar *Superoksida dismutase* (SOD) dan kadar *Malondialdehid* (MDA) otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina yang mengalami nekrosis ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri atas 2 faktor dengan 3 kali ulangan. Faktor pertama dalam penelitian ini adalah sediaan daun pegagan yang terdiri atas 3 bentuk sediaan yaitu bentuk ekstrak, air rebusan dan segar. Faktor kedua adalah lama pemberian sediaan daun pegagan (28 hari dan 42 hari). Perlakuan dalam penelitian adalah hasil kombinasi antar faktor dari seluruh taraf perlakuan yaitu terdiri atas 10 perlakuan termasuk di dalamnya 2 kontrol (kontrol positif dan negatif) masing-masing terdiri atas 3 ulangan.

Faktor I adalah bentuk sediaan tanaman pegagan, yaitu:

A= bentuk segar

B= bentuk air rebusan

C= bentuk ekstrak

Faktor II adalah lama pemberian sediaan pegagan, yaitu:

1 = selama 28 hari

2 = selama 42 hari

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan antara Bentuk sediaan pegagan dan Lama Pemberian sediaan pegagan

Bentuk Sediaan	Lama pemberian (hari)
Bentuk segar	28
Bentuk air rebusan	
Bentuk ekstrak	
Bentuk segar	42
Bentuk air rebusan	
Bentuk ekstrak	

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel yang meliputi:

1. Variabel bebas yaitu faktor yang sengaja diubah atau dimanipulasi oleh peneliti dengan maksud untuk mengetahui perubahan apa yang terjadi (Nurhayati, 2007). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bentuk sediaan pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban), yang terdiri atas 3 bentuk yaitu: ekstrak dengan dosis 300 mg/kg BB/hari; air rebusan dengan dosis 3,2 ml/kg BB/hari dan segar dengan dosis 1 g/kg BB/hari masing-masing diberikan selama 0, 28 dan 42 hari.
2. Variabel terikat yaitu faktor yang diukur atau diamati sebagai akibat dari manipulasi variabel bebas (Nurhayati, 2007). Variabel terikat yang digunakan adalah kadar *Superoxide dismutasi* (SOD) dan kadar *Malondialdehid* (MDA) pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina.
3. Variabel kendali yaitu faktor yang sengaja dikendalikan supaya tidak mempengaruhi variabel bebas maupun variabel terikat (Nurhayati, 2007). Variabel terkontrol adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina Strain Wistar yang diberi makan pellet, diberi minum secara ad libitum (berlebih), dan kandang atau bak plastik dengan alas sekam.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Juli sampai November 2011, bertempat di Laboratorium Biosistem dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina Strain Wistar dengan umur \pm 4 bulan, berat badan 200-300 g. Perkiraan besar sampel yang digunakan adalah sekitar 30 ekor tikus betina yang dibagi menjadi 10 kelompok perlakuan, setiap kelompok perlakuan terdiri dari 3 ekor tikus sebagai ulangan.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi: kandang pemeliharaan, disposable syringe 1 ml, sonde lambung hasil modifikasi dari spuit 3 ml dan *pediatric feeding tube Fr.5*, timbangan analitik, corong buchner, perangkat rotary evaporator vacum, alat gelas, hot plate, pipet tetes, dissecting set, papan seksi, botol organ, tissue processor, tissue embedding, microtome, water bath, tube, vortex, mikropipet, blue tip, yellow tip, white tip, inkubator, sentrifuge, spektro, dan kuvet.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, pelet, air sumur, serbuk daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) diperoleh dari Balai Materia Medika Batu, Na CMC, NaCl fisiologis 0,9%, aquades, cloroform, formalin 10%, ethanol (80%, 90%, 96% dan absolut), parafin, running tap water, xylene, eosin stain, serum plasma eritrosit organ, PBS, xantine, xantine oksidase, dan NBT .

3.6 Pelaksanaan Penelitian

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dilakukan disiapkan tempat pemeliharaan hewan coba yang meliputi kandang (bak plastik) berbentuk segi empat, sekam, tempat makan dan minum tikus. Tikus diaklimasi di laboratorium selama 2 minggu kemudian dibagi menjadi beberapa kelompok yang terdiri atas kontrol (tikus normal tidak mengalami nekrosis neuron otak) dan kelompok perlakuan yaitu tikus yang mengalami nekrosis neuron otak. Untuk membuat tikus mengalami nekrosis neuron otak, maka tikus diinduksi dengan alloxan secara intravena sebanyak 2 kali dengan dosis 65 mg/kg BB single dose. Setelah 5 hari tikus-tikus yang sudah mengalami nekrosis dibagi menjadi beberapa kelompok perlakuan.

3.6.2 Penyerentakan Siklus Birahi

Sebelum diberikan perlakuan maka perlu dilakukan penyerentakan birahi. Hal ini dilakukan karena hewan coba yang digunakan berjenis kelamin betina, dimana kondisifisiologis tubuhnya cenderung dipengaruhi oleh siklus birahi. Penyerentakan dilakukan dengan memberikan preparat hormon prostaglandin sebanyak 0,4 ml yang diinjeksikan secara intramuskular.

3.6.3. Membuat Kondisi Nekrosis Otak

Ahmadpour *et.al.* (2008), dalam penelitiannya menyatakan bahwa peningkatan kadar gula darah dapat menyebabkan penurunan jumlah proliferasi sel pada *dentate gyrus* di otak yang diikuti kematian sel. Untuk membuat tikus mengalami nekrosis neuron otak, maka tikus diinduksi aloksan secara intravena sebanyak 2 kali dengan dosis 65 mg/kg BB sehingga menderita diabetes kronis. Induksi yang pertama dosis yang digunakan adalah 65 mg/kg BB. Sebelum penyuntikan, tikus dipuasakan selama 24 jam. Hari ke 8 setelah penyuntikan pertama, tikus diinduksi kembali dengan alloxan monohidrat dengan dosis 65 mg/kg BB.

Untuk mengetahui kurun waktu kerusakan neuron otak tikus dilakukan konversi usia manusia ke usia tikus, dimana 10 tahun kurun waktu pada manusia sama dengan 1 bulan (4 minggu) kurun waktu tikus (Djari, 2008). Diperkirakan

dalam kurun waktu 4 minggu sudah terjadi kerusakan mikrovaskular yang menyebabkan terjadinya nekrosis akut pada neuron otak karena kerusakan mikrovaskular pada manusia terjadi dalam kurun waktu 10-15 tahun. Pada penelitian ini tikus yang telah diinduksi aloksan dibiarkan selama 6 minggu untuk menunggu terjadinya nekrosis otak. Diperkirakan dalam kurun waktu 6 minggu sudah terjadi kerusakan mikrovaskular yang menyebabkan terjadinya nekrosis akut pada neuron otak.

3.6.4 Pembagian Kelompok Sampel

Setelah diinduksi dengan alloxan, maka tikus dibagi menjadi 10 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor tikus sebagai ulangan. Kelompok tersebut dibagi sebagai berikut:

- a. Kelompok I (kontrol -1) : Tikus diberikan aquades selama 28 hari kemudian dibedah pada hari 29.
- b. Kelompok II (kontrol - 2) : Tikus diberikan aquades selama 42 hari kemudian dibedah pada hari 43.
- c. Kelompok III (kontrol + 1): Tikus diinduksi dengan alloxan tanpa pemberian pegagan kemudian dibedah pada hari 29.
- d. Kelompok IV (kontrol + 2): Tikus diinduksi dengan alloxan tanpa pemberian pegagan kemudian dibedah pada hari 43.
- e. Kelompok V: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi ekstrak pegagan dengan dosis 300 mg/kg BB per hari selama 28 hari kemudian dibedah pada hari 29.
- f. Kelompok VI: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi ekstrak pegagan dengan dosis 300 mg/kg BB per hari selama 42 hari kemudian dibedah pada hari 43.
- g. Kelompok VII: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi daun pegagan segar sebanyak 0,2 gram/kg BB per hari selama 28 hari kemudian dibedah pada hari 29.
- h. Kelompok VIII: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi daun pegagan segar sebanyak 0,2 gram/kg BB per hari selama 42 hari kemudian dibedah pada hari 43.

- i. Kelompok IX: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi air rebusan daun pegagan sebanyak 0,64 ml/kg BB per hari selama 28 hari kemudian dibedah pada hari 29.
- j. Kelompok X: Tikus diinduksi dengan aloksan dan diberi air rebusan daun pegagan sebanyak 0,64 ml/kg BB per hari selama 42 hari kemudian dibedah pada hari 43.

3.6.5 Pembuatan Bentuk Sediaan Pegagan

3.6.5.1 Ekstrak Pegagan

Pembuatan ekstrak pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dilakukan melalui tahapan sebagai berikut: Serbuk daun pegagan yang telah halus dimaserasi dengan pelarut ethanol 70% selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Serbuk yang telah dimaserasi disaring dengan corong buchner. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang dihasilkan selanjutnya disimpan dan digunakan untuk perlakuan (Kumar dan Gupta, 2003). Ekstrak kental tersebut agar bisa diberikan pada hewan coba dilarutkan terlebih dahulu dengan Na CMC 0,5% sebagai surfaktan sampai volume 1 mL.

3.6.5.2 Air Rebusan Pegagan

Pembuatan air rebusan berdasarkan kebiasaan yang dilakukan masyarakat Jawa yaitu: segenggam penuh daun pegagan (kira-kira 20 lembar) direbus dengan 1 gelas air sampai menjadi $\frac{1}{2}$ gelas (50 ml) diminum 3 kali sehari (Mardisiswoyo, 1985). Manusia dewasa dengan berat badan 70 kg mengkonsumsi 150-300 ml per hari atau rata-rata 225 ml berarti dosis per kg BB adalah 3,2 ml, tikus dengan berat 200 g mengkonsumsi sebanyak 0,64 ml.

3.6.5.3 Daun Segar Pegagan

Pengkonsumsian daun pegagan segar berdasarkan jumlah konsumsi lalapan segar daun pegagan oleh masyarakat Jawa yaitu dalam sehari kira-kira 70 g daun pegagan (Wijayakusuma, 1994). Manusia dewasa dengan berat badan 70 kg mengkonsumsi 70 g per hari berarti dosis per kg BB adalah 1 g, tikus dengan berat 200 g mengkonsumsi sebanyak 0,2 g daun pegagan segar.

3.6.6 Pembuatan Sediaan Larutan Na CMC 0,5%

Sediaan larutan Na CMC 0,5% dibuat dengan menaburkan 500 mg Na CMC ke dalam 10 ml aquadest panas, kemudian dibiarkan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai jel. Selanjutnya diaduk hingga menjadi massa yang homogen dan diencerkan dalam labu ukur dengan aquadest hingga volume 100 ml.

3.6.7 Pemberian Perlakuan

Beberapa bentuk sediaan pegagan diberikan pada tikus betina secara oral setelah 6 minggu setelah injeksi alloxan monohidrat.. Pemberian beberapa bentuk sediaan pegagan dilakukan selama 28 hari dan 42 hari sesuai dosis dan volume yang telah ditentukan agar tidak melebihi kapasitas gastrik tikus, kemudian pada hari ke 29 dan ke 43 dilakukan pembedahan pengambilan organ otak untuk dianalisis kadar antioksidan *Superoksida dismutase* (SOD) dan kadar *Malondialdehida* (MDA).

3.6.8 Pengukuran Kadar Antioksidan

3.6.8.1. Pengukuran Kadar *Superoksida dismutase* (SOD)

Aktivitas SOD diuji dengan metode Kakkar, *et al.* (1984), menggunakan sampel berupa organ (Otak) Tikus (*Rattus norvegicus*) Betina. Pada tahap yang pertama, mengambil organ (otak) sebanyak 100 mg dihomogenkan hingga tercampur, ditambahkan 1 ml PBS kemudian hasilnya ditampung kedalam ependorf. Ditambahkan bahan campuran penguat reaksi agar terdeteksi ketika di spektrofotometer berupa Xantine sebanyak 100 μ l, Xantine Oksidase sebanyak 100 μ l dan 100 μ l NBT. Ketika larutan tersebut sudah terhomogenkan selanjutnya diinkubasi (dengan tekanan suhu 30° C selama 30 menit dan disentrifus dengan tekanan 3500 rpm selama 10 menit), kemudian diambil supernatannya dengan menggunakan mikropipet dan ditambahkan larutan PBS hingga 3500 μ l. Jumlah chromogen yang terbentuk diukur absorbansinya dengan spektrofotometer kecepatan maksimal (500-600 nm).

3.6.8.2. Pengukuran Kadar *Malondialdehida* (MDA)

Pengukuran MDA diuji dengan metode Kakkar, *et al.* (1984), menggunakan sampel organ otak tikus betina. Dengan menghomogenkan 10 mg

organ otak, ditambahkan 1 ml akuades yang ditampung di dalam ependorf dengan menggunakan mikropipet. Campurkan dengan beberapa reaksi larutan (TCA 100% sebanyak 100 μ l, Na Thio 1% sebanyak 100 μ l dan HCL 1N sebanyak 250 μ l). Sebelum disentrifus dengan tekanan 3500 rpm selama 10 menit terlebih dahulu dipanaskan dengan tekanan 100° C selama 20 menit. Selanjutnya diambil supernatnya dengan menggunakan mikropipet dan ditambahkan akuades sampai dengan 3500 μ l. Jumlah chromogen yang terbentuk diukur absorbansinya dengan spektro kecepatan maksimal (500-600 nm).

3.7 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian bentuk sediaan pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap kadar *Superoksida dismutase* (SOD) dan kadar *Malondialdehid* (MDA) Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Betina yang diinduksi alloxan. Data yang sudah diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan uji *Two Way Anova*. Jika $F_{hitung} > F_{tabel}$ 1%, maka H_0 ditolak. Apabila terjadi perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan uji lanjut BNJ dengan taraf signifikan 1%.